



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

| | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12N 15/80, 15/56, 15/62 C12N 15/56, C12P 21/02 // (C12N 15/80, C12R 1/645) | A1 | (11) Numéro de publication internationale: WO 91/00357 (43) Date de publication internationale: 10 janvier 1991 (10.01.91) |
| (21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR90/00479 (22) Date de dépôt international: 28 juin 1990 (28.06.90) (30) Données relatives à la priorité: 89/08838 30 juin 1989 (30.06.89) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CAYLA [FR/FR]; Centre Commercial de Gros, Avenue de Lar- rieu, F-31094 Toulouse Cédex (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : CALMELS, Thierry [FR/FR]; 8, rue de l'Ukraine, F-31100 Toulouse (FR). DURAND, Henri [FR/FR]; 26, allées des Sylphes, F- 31520 Ramonville (FR). | | (74) Mandataire: WARCOIN, Jacques; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR). (81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet euro- péen), CA, CH (brevet européen), DE (brevet euro- péen)*, DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), NL (brevet euro- péen), SE (brevet européen), US. Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des</i> <i>revendications, sera republiée si de telles modifications sont</i> <i>reçues.</i> |
| (54) Title: NEW STRAIN WITH FILAMENTOUS FUNGI MUTANTS, PROCESS FOR THE PRODUCTION OF RECOM- BINANT PROTEINS USING SAID STRAIN, AND STRAINS AND PROTEINS PRODUCED BY SAID PROCESS (54) Titre: NOUVELLE SOUCHE ET SES MUTANTS DE CHAMPIGNONS FILAMENTEUX, PROCEDE DE PRODUC- TION DE PROTEINES RECOMBINANTES A L'AIDE DE LADITE SOUCHE ET SOUCHES ET PROTEINES OBTENUES SELON CE PROCEDE (57) Abstract <p>The invention relates to a process for the production of recombinant protein using fibrous fungi, characterised by the fact that a strain of the genus Tolypocladium, into which a DNA sequence coding for said protein which has been placed under the control of elements guaranteeing the expression of said sequence in said strain, has been introduced, is cultivated on an appropriate medium and by the fact that said protein is recovered. The invention also relates to the proteins and strains obtained by putting said process into effect.</p> (57) Abrégé <p>La présente invention se rapporte à un procédé de production de protéine recombinante à l'aide de champignons filamenteux, caractérisé en ce qu'on cultive sur un milieu approprié une souche de genre Tolypocladium dans laquelle on a introduit une séquence d'ADN codant pour ladite protéine placée sous le contrôle d'éléments assurant l'expression de ladite séquence dans ladite souche et en ce qu'on récupère ladite protéine. La présente invention concerne également les protéines et les souches obtenues par la mise en œuvre dudit procédé.</p> | | |

DESIGNATIONS DE "DE"

Jusqu'à nouvel avis, toute désignation de "DE" dans toute demande internationale dont la date de dépôt international est antérieure au 3 octobre 1990 a effet dans le territoire de la République fédérale d'Allemagne à l'exception du territoire de l'ancienne République démocratique allemande.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

| | | | | | |
|----|-----------------------------------|----|--------------------------------------------|----|-----------------------|
| AT | Autriche | ES | Espagne | MC | Monaco |
| AU | Australie | FI | Finlande | MG | Madagascar |
| BB | Barbaude | FR | France | ML | Mali |
| BE | Belgique | GA | Gabon | MR | Mauritanie |
| BF | Burkina Fasso | GB | Royaume-Uni | MW | Malawi |
| BG | Bulgarie | GR | Grèce | NL | Pays-Bas |
| BJ | Bénin | HU | Hongrie | NO | Norvège |
| BR | Brésil | IT | Italie | RO | Roumanie |
| CA | Canada | JP | Japon | SD | Soudan |
| CF | République Centrafricaine | KP | République populaire démocratique de Corée | SE | Suède |
| CG | Congo | KR | République de Corée | SN | Sénégal |
| CH | Suisse | LI | Liechtenstein | SU | Union soviétique |
| CM | Cameroun | LK | Sri Lanka | TD | Tchad |
| DE | Allemagne, République fédérale d' | LU | Luxembourg | TC | Togo |
| DK | Danemark | | | US | Etats-Unis d'Amérique |

NOUVELLE SOUCHE ET SES MUTANTS DE CHAMPIGNONS FILAMEN-
TEUX, PROCEDE DE PRODUCTION DE PROTEINES RECOMBINANTES
A L'AIDE DE LADITE SOUCHE ET SOUCHES ET PROTEINES OBTENUES SELON CE PROCEDE.

La présente invention concerne une souche nouvelle de champignon filamenteux, ainsi que les dérivés de cette souche obtenus par mutation ou par manipulation génétique, et un procédé pour la production de protéine recombinate, à l'aide desdites souches.

On entend par protéines recombinantes les molécules polypeptidiques synthétisées par un microorganisme ou une population cellulaire par suite de l'introduction dans le matériel génétique dudit microorganisme ou desdites cellules d'un gène codant pour la protéine considérée. Le gène en question, appelé gène hétérologue, peut provenir d'un autre organisme vivant ou être synthétisé artificiellement. La possibilité d'introduire et de faire exprimer des gènes hétérologues a été tout d'abord mise en évidence et appliquée en utilisant des bactéries, et plus particulièrement Escherichia coli, comme cellules hôtes. Plus récemment, des productions de protéines recombinantes par d'autres microorganismes dont des levures et des champignons ainsi que par des cultures de cellules d'organismes supérieurs ont été décrites.

Les champignons filamenteux sont utilisés couramment dans l'industrie des fermentations notamment pour la fabrication de certains antibiotiques (pénicillines, céphalosporines) et d'un grand nombre d'enzymes (glucoamylases, cellulases, protéases, pectinases ...).

Les champignons filamenteux présentent un certain nombre d'avantages par rapport aux microorganismes

procaryotes (bactéries) en particulier la capacité d'excréter de grandes quantités et une grande variété de protéines présentant des modifications post traductionnelles, notamment des glycosylations, spécifiques des eucaryotes. Par rapport aux cellules d'eucaryotes supérieurs, les champignons sont beaucoup plus faciles à cultiver à grande échelle, la séparation du mycélium et du milieu de culture après la fermentation est aussi très facile.

La présente invention se rapporte à un procédé de production de protéine recombinante à l'aide de champignons filamenteux, caractérisé en ce qu'on cultive sur un milieu approprié une souche du genre *Tolypocladium* dans laquelle on a introduit une séquence d'ADN codant pour ladite protéine placée sous le contrôle d'éléments assurant l'expression de ladite séquence dans ladite souche et en ce qu'on récupère ladite protéine.

Plus précisément, la souche utilisée est une souche *Tolypocladium geodes*. Cette souche a été déposée sous le n° I-880 le 29 juin 1989 à la Collection Nationale de Culture des Microorganismes - 28, rue du Docteur Roux - 75015 PARIS.

L'invention concerne également les mutants déficients en activité protéasique et/ou hyperexcréteur de protéine exogène de cette souche.

La présente invention repose notamment sur l'isolement d'une nouvelle souche de champignon filamenteux particulièrement adaptée à la production de protéines recombinantes.

La souche sauvage NC14 a été isolée à partir d'un échantillon de terre riche en matières organiques en décomposition (humus d'un sous-bois de la région de Graulhet, Tarn, France). Elle a été primitivement sélectionnée pour sa forte activité protéolytique, et s'est avérée à l'analyse produire des quantités notables d'au-

tres enzymes extracellulaires, chitinases et β -glucanases en particulier.

La souche NC14 a été confiée pour identification au laboratoire du Muséum National d'Histoire Naturelle à Paris. Elle a été repiquée en boîtes de Pétri sur deux milieux de culture standard, utilisés pour la détermination des hyphomycètes : Malt-agar 2 % et Potato Dextrose Agar (PDA) puis incubée à 25°C.

La culture sur Malt se développe lentement, à peine 1 cm en 3 semaines de culture et forme une colonie serrée d'aspect humide. L'observation microscopique montre un mycélium hétérogène, au cytoplasme vacuolisé. Les conidies sont très rares et les cellules sporogènes peu nombreuses et dispersées.

Le milieu PDA est plus favorable. La culture a une croissance lente, atteignant 13 à 20 mm en 10 jours. Le thalle est blanc, floconneux en surface, assez dense en profondeur, au contour irrégulier. On observe une légère pigmentation beige au revers, aucun pigment ne diffuse dans le milieu. Pas d'odeur caractéristique.

L'observation microscopique montre des cellules sporogènes (phialides) solidaires ou groupées par deux ou trois sur une courte cellule latérale du mycélium. Les phialides mesurent de 9 à 14 μ m de long, sont légèrement renflées à la base puis allongées vers le col qui est quelquefois recourbé. Les spores (conidies) sont groupées en têtes ; de forme très hétérogène (sphériques, cylindriques, ovales) avec des rapports globalement entre 3,6-0,9 μ m de long sur 2,9-0,9 μ m de large avec deux classes principales : 3 x 1,5 (cylindriques) et 1,5 x 1,8 (globuleuses). Le mycélium mesure entre 1,5 et 2 μ m de large. Pas de chlamydospores.

L'aspect cultural, la vitesse de développement et la morphologie de l'appareil sporogène font que cette espèce appartient au genre Tolypocladium (Gams) par la

forme, la taille et le groupement des phialides beaucoup plus renflées et groupées en verticilles chez inflatum. Elle diffère aussi de T.cyindrosporum (Gams) par la forme des phialides mais surtout par la forme des spores régulièrement cylindriques chez T.cyindrosporum. La souche NC14 est finalement très proche de l'espèce geodes (Gams) par le mode de groupement des phialides décrit plus haut, par leur forme ainsi que par l'aspect cultural. Malgré l'hétérogénéité des spores, de taille et de forme très hétérogènes, 40 % de celles-ci correspondent aux caractéristiques de Tolypocladium geodes (Gams) c'est-à-dire 1,6 sur 2,2 μ m.

Il s'agit donc d'une souche de Tolypocladium geodes dont la morphologie des spores est quelque peu atypique.

La souche NC14 de Tolypocladium geodes a fait l'objet d'un programme d'amélioration génétique, consistant à sélectionner de façon récurrente des mutants de plus en plus fortement producteurs d'enzymes protéolytiques, puis d'enzymes chitinolytiques. Les méthodologies de mutagenèse et de sélection utilisées sont celles précédemment décrites pour Trichoderma reesei (DURAND et al., Enzyme Microb. Technol., 1988, 10 : 341) et pour Penicillium occitanis (JAIN et al., soumis à publication dans Enzyme Microbiol. Technology). La première étape de sélection a été effectuée à partir d'une suspension de spores de la souche NC14 traitée par un agent mutagène, la lumière ultraviolette. Une dilution de ladite suspension de spores a servi à inoculer des boîtes de Pétri contenant un milieu gélosé de composition suivante :

| | | |
|----------------------------|---|---------|
| - poudre de lait écrémé | : | 10 g |
| - phosphate monopotassique | : | 2 g |
| - sulfate de magnésium | : | 0,3 g |
| - chlorure de calcium | : | 0,2 g |
| - sulfate de fer | : | 0,005 g |

- extrait de levure : 1 g
- agar agar : 15 g
- eau désionisée qsp : 1 litre

pH ajusté à 7,0 avec de la soude

5 Après incubation 5 jours à 27°C, les colonies
apparus sur ce milieu sont entourées d'un halo clair,
dû à l'hydrolyse des protéines du lait par les enzymes
protéolytiques excrétées par la souche. Ce crible de sé-
lection, qui avait déjà été utilisé pour l'isolement de
10 la souche NC14, a permis la recherche de mutants meilleurs
producteurs de protéases; ceux-ci sont détectés par l'ap-
parition d'un halo d'hydrolyse d'un diamètre nettement
supérieur à la moyenne de ceux observés autour des colo-
nies de la souche de départ. Un mutant, appelé NC18, ca-
15 ractérisé par un halo d'hydrolyse très significativement
augmenté, a été isolé. A partir de la souche NC18, une
deuxième étape de sélection a été effectuée, après muta-
génèse par la N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG)
sur le milieu mentionné ci-dessus auquel a été rajouté
20 de l'hydrolysate acide de caséine (Biokar) à la concentra-
tion de 5 g/l. Dans ces conditions, la production de pro-
téases par la souche NC18 est réprimée, ce qui se tra-
duit par une diminution très nette de la taille des ha-
los d'hydrolyse. Une colonie entourée d'un large halo a
25 été sélectionnée; le mutant ainsi isolé, NC21 a fait
l'objet d'une nouvelle étape de sélection après mutagé-
nèse par l'éthyl-méthane sulfonate (EMS) sur le milieu
à base de poudre de lait, auquel du sulfate d'ammonium
à la concentration de 5 g/l a été ajouté comme répresseur
30 de la production de protéases. Un mutant dé-réprimé,
NC28, a ainsi été isolé. A partir de cette dernière
souche, un mutant hyperproducteur d'activité chitino-
lytique a été recherché, après mutagénèse par l'acide ni-
treux, sur le milieu de base précédemment décrit, où la
35 poudre de lait a été remplacée par de la chitine colloï-

dale à la concentration de 10 g/l. Un mutant hyperchitinytique, NC35, sélectionné sur la base de la taille du halo d'hydrolyse de la chitine, a été soumis à une nouvelle étape de sélection sur le même milieu à base de chitine, contenant en plus 10 g/l de glucose comme ré-
5 presseur. Une souche mutante isolée sur ce milieu, NC39 a été retenue. Cette souche s'est révélée hyper-excrétrice de protéines : des concentrations de l'ordre de 10 g/l de protéines ont été obtenues en 6 jours de
10 fermentation, dans un milieu chimiquement défini (milieu salin de base selon MANDELS et WEBER, J. Adv. Chem. Ser., 1969, 95 : 391) contenant du glucose (ajouté en continu à raison de 20 g/l par jour) comme seule source de carbone. Dans les mêmes conditions, la souche sauvage NC14
15 produit environ 0,5 g/l de protéines extracellulaires.

Cette aptitude exceptionnelle de la souche NC39 à excréter des protéines dans des conditions et un milieu de culture extrêmement simples, qui constitue un des aspects de la présente invention, a conduit à envisager de
20 l'utiliser pour la production de protéines hétérologues. Cependant, dans cette optique, la forte activité protéolytique des souches constitue un inconvénient. Aussi à partir de la souche NC39, des mutants déficients en protéases ont été recherchés. Après mutagénèse à la NTG,
25 puis à l'EMS, des colonies ne produisant pas de halo d'hydrolyse sur milieu à base de poudre de lait additionné de glucose (2 g/l) et de sulfate d'ammonium (0,5 g/l) ont été sélectionnées en deux étapes. La souche NC46 ainsi isolée se caractérise par l'absence d'activité protéolytique détectable par le test à l'azocaséine (TOMARELLI
30 et al., J. Lab. Clin. Med., 1949, 34 : 428) dans le surnageant de culture, dans les conditions de production de protéines extracellulaires mentionnées plus haut et décrites dans l'exemple II ci-après. Cette souche NC46 a
35 été soumise à un nouveau traitement mutagène par l'acide

nitreux, puis des mutants déficients en activité amino
peptidase ont été recherchés selon une modification
de la technique décrite par MILLER et MACKINNON (J.Bact.,
1974, 120 : 355) : après croissance 4 jours sur le milieu
5 à base de poudre de lait décrit ci-dessus, les colonies
sont recouvertes d'une solution contenant : 0,5 mg/ml de
L. Leucine- β -naphtylamide et 2 mg/ml de Fast Garnet
GBC (Sigma). La présence d'activité aminopeptidase est
visualisée par l'apparition, après quelques minutes, d'une
10 coloration brune autour des colonies. Les colonies ne
produisant pas de coloration sont récupérées et re-
testées, selon le même protocole.

Un mutant isolé par cette technique, NC50, ne
présente plus l'activité Leucine aminopeptidase détectée
15 dans le surnageant des cultures des souches NC46 et des
générations précédentes.

La généalogie de la souche NC50 est résumée sur
le tableau 1.

La souche mutante NC50 possède les mêmes capa-
20 cités d'excrétion de protéines du point de vue quantita-
tif, que la souche hyperexcrétrice NC39 mentionnée ci-
dessus. Un avantage supplémentaire de la souche NC50 ré-
side dans l'absence d'activité protéolytique détectable
dans les surnageants de culture, ce qui permet d'éviter
25 ou tout au moins de minimiser la dégradation des pro-
téines produites, et particulièrement des protéines hété-
rologues, dans le milieu de fermentation. Ceci constitue
un aspect important de la présente invention.

Un autre aspect est constitué par la mise en
30 évidence de la capacité des souches NC14 et dérivées à
être transformées selon un protocole simplifié, original
par rapport à ceux mentionnés .

Tableau 1 : Généalogie des souches mutantes dérivées de
Tolypocladium geodes NC14

| 5 | Etape n° | Agent mutagène | Phénotype recherché | Milieu de sélection | Souche isolée |
|----|-------------|-------------------|----------------------------------|-----------------------------------------------------|------------------|
| | | | | | |
| 10 | 1 | UV | Hyperproducteur de protéases | Lait écrémé | NC18 |
| | 2 | NTG | Protéases dé- réprimées | Lait écrémé + hydrolysate de caséine 5 g/l | NC21 |
| | 3 | EMS | Protéases dé- réprimées | Lait écrémé + sulfate d'am- monium 5 g/l | NC28 |
| 15 | 4 | HNO ₃ | Hyperproducteur de chitinasés | Chitine col- loïdale | NC35 |
| | 5 | UV | Chitinasés dé- réprimées | Chitine col- loïdale + glucose 10 g/l | NC39 |
| 20 | 6 | NTG | Protéases déficientes | Lait écrémé | NC41 |
| | 7 | EMS | Protéases déficientes | Lait écrémé | NC46 |
| 25 | 8 | HNO ₃ | Amino-peptidase déficiente | Lait écrémé + test L-leucine- β -naphtylamide | NC50 |

antérieurement pour d'autres champignons comme Aspergil-
lus nidulans (BALLANCE et al., Biochem. Biophys. Res.
Commun, 1983, 112 : 284) ou Trichoderma reesei (KNOWLES
et al., Brevet Européen n° EP 0244234 A2, 1987). L'ori-
ginalité du protocole réside en particulier dans le fait
qu'il ne fait pas appel à l'utilisation de protoplastes,
dont la formation et la régénération constituent souvent
une étape fastidieuse dans la mise au point d'un protocole

de transformation. Dans le cas de la souche NC14 et de ses dérivés, il a été trouvé que de l'ADN étranger pouvait être introduit, avec une fréquence élevée, dans des spores traitées de façon ménagée avec une enzyme lytique de telle sorte que leur résistance à la pression osmotique et leur capacité de germination ne soient pas altérées. La mise au point du protocole de transformation a été effectuée en utilisant un ADN plasmidique portant un marqueur dominant sélectionnable : un gène conférant la résistance à la phléomycine (ARMAU et al., Brevet Français, n° 2 569 723. Ce protocole est décrit dans l'exemple I ci-après.

Selon la présente invention, les éléments assurant l'expression de ladite séquence d'ADN dans la souche comprennent essentiellement une séquence promotrice d'un gène d'origine fongique. Cette séquence d'ADN codant pour ladite protéine sera précédée d'une séquence signal assurant l'excrétion de la protéine et suivie d'une séquence terminateur de transcription.

Un aspect supplémentaire de la présente invention est constituée par la possibilité de sélectionner des souches transformées pour lesquelles l'expression du gène d'intérêt est amplifiée, grâce à un crible de sélection basé sur l'utilisation d'un gène constituant un marqueur dominant, placé en aval du gène d'intérêt, sans promoteur ni signal d'arrêt de transcription entre les deux gènes. Cette technique est illustrée dans l'exemple V ci-après.

Ce gène constituant le marqueur code pour la résistance à un antibiotique qui est de préférence un composé de la famille des phléomycines.

Dans le cas d'un gène codant pour la résistance à un antibiotique de la famille des phléomycines, ce gène est d'origine génomique et provient du génome des actinomycètes producteur dudit antibiotique.

La séquence d'ADN codant pour ladite protéine ainsi que les éléments assurant l'expression de ladite séquence seront portés par un plasmide qui de préférence est un plasmide à répllication autonome comportant une
5 séquence de répllication autonome efficace chez Tolypocladium T.A.R.S.

Selon l'invention, ledit plasmide assure l'intégration chromosomique des séquences d'ADN en cause.

En résumé, la présente invention concerne une
10 nouvelle souche de champignon filamenteux, Tolypocladium geodes NC14, et les mutants issus de cette souche, sélectionnés pour leur capacité à excréter de grandes quantités de protéines dans un milieu de culture extrêmement simple, constitué essentiellement de sucres et de sels
15 minéraux, ce qui facilite l'extraction et la purification desdites protéines. Cette capacité exceptionnelle peut être exploitée pour la production de protéines recombinantes ce qui constitue un premier aspect de la présente invention.

20 Selon un deuxième aspect, la présente invention fournit un moyen de préserver la stabilité des protéines excrétées dans le milieu de culture par l'utilisation de mutants déficients en activités protéolytiques.

Selon un troisième aspect, la présente invention
25 fournit un moyen d'introduire des gènes hétérologues dans la souche de Tolypocladium geodes NC14 et ses dérivés selon un protocole simplifié ne faisant pas intervenir les protoplastes.

Selon un quatrième aspect de la présente invention, l'expression des gènes hétérologues par Tolypocladium geodes NC14 et ses dérivés peut être augmentée par
30 une technique de sélection faisant appel à un marqueur dominant placé en aval du gène d'intérêt sans promoteur ni terminateur entre les deux gènes.

35 La présente invention se rapporte également aux

protéines obtenues par la mise en oeuvre du procédé selon l'invention. Parmi ces protéines codées selon l'invention, on citera plus particulièrement la pullulanase, le lysozyme humain et la protéine Sh, la séquence nucléotidique de cette protéine Sh étant représentée en figure 2.

La présente invention concerne de même les souches de *Tolypocladium* transformées, obtenues lors du procédé de production de protéines recombinantes.

Les exemples suivants servent à illustrer la présente invention de manière non limitative.

Ces exemples seront décrits en se référant aux figures sur lesquelles :

- la figure 1 est un schéma du plasmide pUT720
- la figure 2 représente la séquence nucléotidique du gène de la protéine Sh précédé de la séquence synthétique utilisée comme signal d'excrétion
- la figure 3 est un schéma du plasmide pUT715
- la figure 4 est un schéma du plasmide pUT771
- la figure 5 représente la séquence nucléotidique de la partie promotrice du plasmide pUT771
- la figure 6 est un schéma du plasmide pUT760
- la figure 7 représente la séquence nucléotidique synthétique codant pour le lysozyme humain
- la figure 8 est un schéma du plasmide pUT772

Les abréviations utilisées sur ces figures sont considérées comme connues ou seront explicitées dans la description.

Sauf indication contraire, les différents procédés et produits mentionnés sont mis en oeuvre selon les techniques connues et/ou préconisées par le fabricant.

Exemple I :: Transformation de *Tolypocladium geodes*

La souche mutante NC50, déficiente en activités protéolytiques, a été transformée par le plasmide pUT703 (DURAND et al, Proc. Biochemistry and Genetics of

Cellulose Degradation, JP Aubert Ed., Academic Press, 1988, p. 136). Ce plasmide se caractérise par la présence d'un gène de résistance aux antibiotiques de la famille des phléomycines (ARMAU et al., Brevet Français n° 2 569 723 placé sous la dépendance d'un promoteur fongique : le promoteur du gène de la glycéraldéhyde 3-phosphate deshydrogénase d'Aspergillus nidulans (noté promoteur gpd) (Van GORCOM et al., Gene, 1986, 48 : 211) et borné en aval par le terminateur CYC1 de levure (SMITH et al., Cell, 1979, 16 : 753). Le gène de résistance provient d'un actinomycète producteur d'antibiotiques de la famille des phléomycines; Streptoalloteichus hindustanus. La protéine codée par ce gène, appelée protéine Sh, inactive les antibiotiques en question par formation d'un complexe équimoléculaire (GATIGNOL et al., FEBS Letters, 1988, 230 : 171).

La phléomycine et les antibiotiques apparentés présentent une toxicité élevée pour Tolypocladium geodes comme pour pratiquement tous les organismes vivants. Le gène de résistance fournit donc un moyen facile de sélectionner les clones transformés par leur capacité à se développer en présence de phléomycine.

Le protocole utilisé pour la transformation est le suivant : des spores obtenues par culture de la souche NC50 sur milieu PDA pendant 7 jours à 27°C sont suspendues dans du milieu MnP de composition suivante : milieu salin de base selon Mandels additionné de saccharose 100 g/l, tampon MES 5 g/l, pH 5,5. Après filtration sur verre fritté n° 2 pour éliminer le mycélium, la suspension est centrifugée (10 minutes, 10 000 rpm) et le culot est repris par le même milieu MnP additionné de Caylase C3 (enzyme lytique commercialisée par CAYLA) à 10 mg/ml. Après 4 heures d'incubation sur table agitée à 32°C, 100 rpm la suspension est à nouveau centrifugée, et le culot est repris par du milieu MnP additionné de chlorure

de calcium, 50 mM, dans un volume tel que le titre de la suspension de spores obtenue, déterminé par comptage microscopique à l'hématimètre, soit d'environ 10^8 /ml.

5 A 200 µl de cette suspension, une solution
d'ADN plasmidique (5 à 10 µg d'ADN dans un volume de 5 à
20 µl) est ajoutée. Après 10 minutes à température am-
biente, on ajoute 50 µl de solution MPC (MOPS 10 mM
pH 5,8, PEG 6000 60 % p.v., CaCl_2 75 mM) et on incube
le mélange 30 minutes dans la glace, puis on rajoute
10 2,5 ml de MPC. Après 15 minutes à température ambiante,
des aliquots de 0,5 ml de ce mélange sont introduits
dans des tubes contenant chacun 3 ml de gélose molle MnR
(milieu salin selon Mandels additionné de saccharose 150
g/l, glucose 2,5 g/l, extrait de levure 2,5 g/l, agar
15 6 g/l) maintenu en surfusion à 45°C. Le contenu de cha-
que tube est ensuite versé à la surface d'une boîte de
Pétri contenant le même milieu MnR, gélosé à 15 g/l et
additionné de 30 µg/ml de phléomycine (commercialisée
par CAYLA) comme agent de sélection des clones transfor-
20 mants. Ceux-ci apparaissent sous la forme de petites
colonies après 4 jours d'incubation à 27°C.

Les taux de transformation obtenus en utilisant
le plasmide pUT703 ont été de l'ordre de 2000 à 5000
transformants par microgramme d'ADN.

25 La stabilité des transformants a été testée par
repiquage des colonies sur milieu PDA contenant 30 µg/ml
de phléomycine (la concentration minimale inhibitrice -
CMI - pour la souche NC50 non transformée est d'environ
10 µg/ml dans ces conditions). Environ 90 % des colonies
30 repiquées ont confirmé leur caractère de résistance.

Des expériences d'hybridation de l'ADN des sou-
ches transformées par une sonde marquée correspondant à
une partie du gène de résistance à la phléomycine ont
montré que ce gène était intégré dans le chromosome des
35 transformants; le ou les sites d'intégration et le nombre

de copies varient d'une souche à l'autre.

Exemple II : Expression et excrétion d'une protéine
hétérologue.

Dans l'exemple I ci-dessus, l'obtention de
5 clones transformants résistants à la phléomycine indique
que le gène codant pour la protéine Sh s'exprime dans la
souche MC50 de Tolypocladium geodes. Cependant, la pro-
téine n'a pas pu être mise en évidence dans les surna-
geants de culture des souches transformées et n'est donc
10 vraisemblablement pas excrétée en quantité détectable.

Dans l'exemple suivant, la souche NC50 a été
transformée selon le protocole décrit dans l'exemple I,
en utilisant le plasmide pUT720 dont la carte est re-
présentée sur la figure 1. Ce plasmide se caractérise par
15 la présence, sous la dépendance du promoteur *gpd*, du
gène de la protéine Sh en amont duquel a été ajoutée une
séquence signal synthétique d'excrétion (figure 2).

Parmi les colonies résistantes, obtenues avec
une fréquence de 3000 transformants par microgramme d'
20 ADN, une centaine ont été repiquées sur des boîtes de
PDA contenant des concentrations croissantes de phléo-
mycine, de 25 à 1000 µg/ml. 3 souches résistantes à
plus de 1000 µg/ml de phléomycine ont ainsi été sélec-
tionnées; l'une d'elles a été cultivée en fermenteur de
25 laboratoire dans les conditions suivantes : les spores
provenant d'une boîte de PDA incubée 7 jours à 27°C ont
servi à inoculer 500 ml de milieu selon Mandels conte-
nant 20 g/l de glucose et 1 g/l d'extrait de levure, ré-
parti dans deux erlenmeyers de 1 l. Après incubation
30 48 heures sur table agitée à 27°C, 200 rpm, cette cul-
ture a permis d'inoculer un fermenteur de 14 litres de
volume total (Chemap) contenant 8 litres du même milieu.
La fermentation a duré 6 jours à 27°C avec une agitation
de 500 rpm et une aération de 0,5 v.v.m., le pH étant
35 régulé supérieur à 5,0 avec de l'ammoniaque. A partir du

2ème jour, une solution stérile de glucose à 200 g/l a été introduite en continu à raison de 0,8 litre par 24 heures, soit environ 20 grammes de glucose par litre et par jour. Après 6 jours, la culture a été récoltée et centrifugée.

La concentration totale en protéines, déterminée selon la méthode de LOWRY (LOWRY et al., J. Biol. Chem., 1951, 193 : 265) a été trouvée égale à 9,6 g/l.

La présence de protéine Sh dans le milieu de culture a été mise en évidence par chromatographie (FPLC) sur colonne échangeuse d'anions MonoQ, Pharmacia (tampon Tris-HCl 20 mM pH 7,0 - élution gradient linéaire 0 - 0,6 M NaCl). En comparaison avec le surnageant d'une culture effectuée dans les mêmes conditions avec la souche non transformée, on constate l'apparition d'un pic supplémentaire de protéines fortement retenues sur la colonne MonoQ, élué à 0,45 M. L'aire de ce pic représente environ 20 % de l'aire totale du chromatogramme. L'analyse en électrophorèse SDS-PAGE, des fractions correspondant à ce pic a révélé la présence à l'état pratiquement pur d'une protéine d'environ 14 000 kD de poids moléculaire, ce qui correspond à la taille de la protéine Sh (GATIGNOL et al., FEBS Letters, 1988, 230 : 171).

La présence dans le surnageant de culture de protéine inactivant la phléomycine a été confirmée par le test suivant : sur des disques de papier imprégnés de solution de phléomycine à différentes concentrations (de 10 à 300 µg/ml) différents volumes de surnageant de culture (de 1 à 50 µl) sont déposés. Les disques sont ensuite posés à la surface d'un milieu gélosé (milieu n° 2 pour l'essai des antibiotiques, BioMérieux)ensemencé par une souche d'Escherichia coli sensible à la phléomycine : HB101. Après une nuit d'incubation à 37°C, des halos d'inhibition du voile bactérien sont visibles autour des disques contenant la phléomycine seule. Lorsque

-16-

des quantités connues de protéine Sh purifiée sont ajoutées, on constate une diminution du diamètre des halos, et une disparition totale de ceux-ci pour un rapport en moles protéines/antibiotiques de 1/1 soit environ 10/1 en poids. Ce test permet donc un dosage semi-quantitatif de la protéine Sh dans une solution de concentration inconnue. Dans le présent exemple, la concentration de protéine Sh dans le surnageant de culture a été trouvée voisine de 2 g/l.

Il a donc été possible par fermentation d'un transformant de la souche de Tolypocladium geodes NC50 par le plasmide pUT720 de produire environ 2 g/l de protéine recombinante extracellulaire en 6 jours.

Exemple III : Isolement d'une séquence promotrice

Le plasmide pUT715, dont la carte est présentée sur la figure 3 a été utilisé comme vecteur-sonde pour la recherche de séquences promotrices fongiques. Le plasmide a été linéarisé par double coupure BamHI-AsuII (les deux sites uniques de restriction sont situés dans la séquence multisites située immédiatement en amont de la partie codante du gène Sh). Après purification par électroélution, le grand fragment a été mis en présence d'ADN chromosomique de Trichoderma reesei partiellement digérée par les enzymes MboI et TaqI pour générer des fragments compris entre 1 et 5 kilobases et d'ADN ligase. La population de plasmides hybrides ainsi obtenue a servi à transformer la souche d'Escherichia coli DH5 α , avec sélection sur la base de la résistance à l'ampicilline. L'ADN plasmidique extrait du "pool" des transformants d'E.coli a servi à transformer la souche NC14 de T.geodes selon le protocole décrit dans l'exemple I ci-dessus. 50 transformants fortement résistants à la phléomycine (CMI > 250 μ g/ml) ont été sélectionnés et répartis en 10 groupes de 5 clones. L'ADN de chaque groupe a été extrait, digéré par l'enzyme BstEII et soumis à ligation.

Avec chaque préparation une transformation de E.coli DH5 α a été effectuée.

L'ADN plasmidique de 6 colonies d'E.coli résultant de chaque transformation soit 60 transformants au total a été analysé individuellement par électrophorèse en gel d'agarose après micro-extraction. 7 plasmides de tailles différentes et supérieures à celle du vecteur pUT715 ont été choisis. Chacun de ces plasmides, extrait de la souche d'E.coli correspondante, a servi à transformer T.geodes NC14. L'une des transformations a conduit à l'apparition de clones fortement résistants à la phléomycine (CMI > 250 μ g/ml) avec une fréquence de l'ordre de 5000 transformants par microgramme d'ADN. Pour deux autres transformations, la fréquence et le niveau de résistance des transformants ont été trouvées beaucoup plus faibles (quelques transformants/ μ g, CMI < 100 μ g/ml). Enfin quatre transformations n'ont donné aucun résultat.

Le plasmide ayant permis la transformation de T.geodes la plus efficace appelée pUT771, a été analysé, il comporte une insertion d'une taille d'environ 1,8 kb ; la cartographie de pUT771 est représentée sur la figure 4. La séquence nucléotidique de la partie promotrice est représentée sur la figure 5.

Au cours d'expériences comparatives, le plasmide pUT771 a toujours conduit à des taux de transformation supérieurs d'un facteur deux environ à ceux obtenus dans les mêmes conditions avec pUT703.

Exemple IV : Co-transformation de T.geodes avec un plasmide portant le marqueur de résistance à la phléomycine et un plasmide portant un gène non sélectionnable.

Une expérience de transformation a été réalisée selon le protocole décrit dans l'exemple I ci-dessus, avec un mélange contenant environ 1 μ g d'ADN plasmidique de pUT771 décrit dans l'exemple II et 10 μ g d'ADN plas-

midique de pUT760, dont la carte est représentée sur la figure 6. Le plasmide pUT760 se caractérise par la présence du gène de Klebsiella pneumoniae ATCC 15050 codant pour la pullulanase mature (MICHAELIS et al., J. Bact., 1985, 164 : 633), sous la dépendance du promoteur gpd d'Aspergillus nidulans et précédé par la séquence signal synthétique décrite dans l'exemple I (figure 2).

Environ 500 transformants sélectionnés sur la base de la résistance à la phléomycine ont été repiqués individuellement d'une part sur un milieu PDA contenant 30 µg/ml de phléomycine et d'autre part sur un milieu gélosé contenant : glucose 5 g/l, sulfate d'ammonium 1 g/l, phosphate monopotassique 2 g/l, sulfate de magnésium 0,3 g/l, chlorure de calcium 0,2 g/l, extrait de levure 1 g/l, pullulane (Sigma) 10 g/l, agar 15 g/l. Après 7 jours d'incubation à 27°C, la surface de ce dernier milieu a été recouverte d'alcool éthylique, et les boîtes de Pétri ont été placées à -20°C pendant une heure. A cette température et en présence d'alcool, le pullulane précipite, rendant le milieu opaque. Environ 2 % des colonies testées étaient entourées d'un halo clair plus ou moins large, dû vraisemblablement à l'hydrolyse du pullulane. Aucun halo n'a été détecté autour des colonies de la souche NC50 non transformée testées dans les mêmes conditions. Les 10 clones transformants semblant présenter la plus forte activité pullulanase, c'est-à-dire ceux correspondant aux colonies entourées des halos les plus larges ont été récupérés sur le milieu PDA-phléomycine et cultivés en fioles agitées dans le milieu selon Mandels additionné de glucose 30 g/l, extrait de levure 1 g/l et tamponné par le phtalate de potassium à 5 g/l. Après 5 jours d'incubation à 27°C, 200 rpm, les cultures ont été centrifugées et l'activité pullulanase a été dosée dans les surnageants selon le protocole suivant :

à 0,5 ml d'une solution de pullulane à 10 g/l dans du tampon acétate 0,1 M pH 5,5, on ajoute 0,5 ml de solution enzymatique (surnageant éventuellement dilué dans le même tampon). Après incubation 60 minutes à 55°C, le glucose libéré est dosé par la méthode de MILLER (Analytical Chem., 1959, 31 : 426). L'activité est exprimée en unités internationales (u.i) correspondant au nombre de micro-moles de glucose libérées par minute. Dans les surnageants des 10 cultures testées, des activités pullulanase de 12 u.i/ml à 350 u.i/ml ont été trouvées. Aucune activité n'a été détectée dans les surnageants de la souche non transformée cultivée dans les mêmes conditions.

Exemple V :

Cet exemple est destiné à illustrer la possibilité de sélectionner préférentiellement des clones recombinants de T.geodes NC14 et de ses dérivés qui soient fortement producteurs d'une protéine hétérologue grâce à des constructions plasmidiques faisant appel au principe de la transcription polycistronique.

L'expression de plusieurs gènes adjacents sous la dépendance du même promoteur et par l'intermédiaire du même ARN messenger, dit polycistronique, est un phénomène bien connu chez les bactéries. En revanche, il est généralement admis que ce phénomène n'existe pas chez les eucaryotes. Cependant, il a été fait état récemment (KAUFMAN et al., EMBO J., 1987, 6 : 187) d'une expression par des cellules animales en culture du gène de la dihydrofolate réductase permettant la résistance au méthotrexate, dans des constructions où ledit gène était placé immédiatement en aval d'un autre gène non sélectionnable, ce dernier étant précédé d'un promoteur. Ceci permet une sélection indirecte des clones exprimant fortement le gène non sélectionnable sur la base du niveau de résistance conféré par le gène placé en aval.

Il a été montré par les auteurs de la présente

invention que ce principe pouvait s'appliquer à T.geodes, en utilisant par exemple comme parqueur sélectionnable le gène Sh de résistance à la phléomycine.

Un gène synthétique pour le lysozyme humain a été préparé par assemblage de 10 oligonucléotides de synthèse. La séquence représentée dans la figure 7 comporte 14 paires de base précédant le codon d'initiation, suivi de 18 codons débutant par un ATG correspondant aux acides aminés du peptide signal du lysozyme humain à l'exception du 17ème codon (remplacement de la glutamine par une leucine) (CHUNG, KESHAU et GORDON, Proc. Natl. Acad. Sci. 1988, 85 : 6227) puis 130 codons des acides aminés du lysozyme humain (JOLLES et JOLLES, Mol. Cell. Biochem., 1984, 63, 165) et enfin un codon stop suivi de 6 paires de bases. Le fragment d'ADN bordé par les sites de restriction EcoRV-BamHI a été cloné au site EcoRV du plasmide pUT771 mentionné dans l'exemple II pour donner dans l'une des 2 orientations possibles, le plasmide pUT772 (figure 8).

La souche NC50 de T.geodes a été transformée par le plasmide pUT772 selon le protocole décrit dans l'exemple I avec la seule différence que la sélection des transformants a été réalisée avec une concentration moindre de phléomycine (15 µg/ml). Les colonies obtenues avec une fréquence 50 à 100 fois moindre à celle fournie par l'ADN pUT771 utilisé comme contrôle ont été repiquées sur milieu PDA et individuellement examinées pour le niveau de résistance à la phléomycine et vérifiée pour la production de lysozyme. La détermination des concentrations minimales inhibitrices de phléomycine des transformants par pUT772 a montré que les niveaux de résistances des clones étaient faibles (2 à 10 fois la CMI par rapport à la souche non transformée) alors que les transformants par pUT771 étaient au contraire très élevés (30 à 200 fois la CMI).

La production de lysozyme est vérifiée indirectement par la méthode des cylindres d'agar pour la production d'une activité lytique contre Micrococcus lysodeikticus sur PDA. Parmi 83 souches testées provenant
5 de la transformation par pUT772, 61 produisaient une activité détectable par la présence d'une auréole d'inhibition autour des cylindres d'agar. En contraste aucune colonie issue de la transformation par pUT771 ne présentait cette activité (55 testées).

10 Une analyse clonale a montré que le caractère de production était conservé pour 2/3 des souches positives après une étape de sporulation. La souche NC50 PUT772-28 sélectionnée parmi les souches les plus actives par le test sur boîte a été plus particulièrement étudiée.

15 Par cultures successives sur milieu solide PDA contenant des concentrations croissantes de phléomycine, un variant de la souche NC50/pUT772-28 a été sélectionné. Ce variant noté NC50/28R4 résiste à 100 µg/ml de phléomycine alors que la concentration maximale de croissance
20 pour le parent est de 20 µg/ml. Les auréoles d'inhibition sur un voile de Micrococcus lysodeikticus sont également supérieures pour la souche NC50/28R4 par comparaison au parent NC50/pUT772-28. Les deux souches ont été cultivées en fiole agitée dans les conditions décrites
25 dans l'exemple, IV. Après cinq jours d'incubation à 27°C l'activité lysozyme a été déterminée par un dosage turbidimétrique à partir de cellules lyophilisées de Micrococcus lysodeikticus (SHUGAR, Biochim. Biophys., 1952, Acta 8 : 302). Les protéines des surnageants des cultures
30 ont été fractionnées sur une colonne MonoS Pharmacia (tampon phosphate 50 mM pH 7,2 - élution gradient linéaire de 0 à 1 M NaCl). Un pic protéique élevé à 0,25 M est présent dans les deux souches transformées et absent chez le parent NC50. Par le test d'activité biologique,
35 identification immunologique avec un anticorps antilyso-

-22-

5 zyme humain et électrophorèse en gel d'acrylamide, il a été vérifié par comparaison avec un échantillon authentique de lysozyme humain que les protéines éluées à 0,25 M renferment du lysozyme. Les concentrations finales dans les surnageants de culture ont été estimées à 25 µg/ml et 200 µg/ml de lysozyme recombinant respectivement pour les souches NC50 pUT772-28 et NC50-28R4.

- REVENDEICATIONS -

- 1 - Procédé de production de protéine recombinante à l'aide de champignons filamenteux, caractérisé en ce qu'on cultive sur un milieu approprié une souche
5 du genre Tolypocladium dans laquelle on a introduit une séquence d'ADN codant pour ladite protéine placée sous le contrôle d'éléments assurant l'expression de ladite séquence dans ladite souche et en ce qu'on récupère ladite protéine.
- 10 2 - Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la souche est une souche de Tolypocladium geodes.
- 15 3 - Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la souche est une souche de Tolypocladium geodes déposée sous le n° I-880, le 29 juin 1989 à la Collection Nationale de Culture des Microorganismes ou l'un de ses mutants déficients en activité protéasique et/ou hyperexcréteur de protéine exogène.
- 20 4 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que les éléments assurant l'expression comprennent essentiellement une séquence promotrice d'un gène d'origine fongique.
- 25 5 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la séquence d'ADN codant pour ladite protéine est précédée d'une séquence signal assurant l'excrétion de la protéine.
- 30 6 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la séquence d'ADN codant pour ladite protéine est suivie d'un gène marqueur sous le contrôle des mêmes éléments d'expression.
- 35 7 - Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que ce gène marqueur code pour la résistance à un antibiotique.
- 8 - Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que l'antibiotique est un composé de la fa-

mille des phléomycines.

5 9 - Procédé selon la revendication 7, caracté-
risé en ce que le gène codant pour la résistance à un
antibiotique de la famille des phléomycines est d'origi-
ne génomique et provient du génome des actinomycètes
producteur dudit antibiotique.

10 10 - Procédé selon l'une des revendications 1 à
9, caractérisé en ce que la protéine codée est choisie
parmi la pullulanase et le lysozyme humain.

11 - Procédé selon l'une des revendications 5 à
10, caractérisé en ce que la séquence signal est la sé-
quence signal synthétique figurant à la figure 2.

15 12 - Procédé selon l'une des revendications 1 à
11, caractérisé en ce que la séquence promotrice est la
séquence promotrice figurant à la figure 5.

13 - Procédé selon l'une des revendications 1 à
12, caractérisé en ce que la séquence d'ADN codant pour
ladite protéine est suivie d'une séquence terminateur de
transcription.

20 14 - Procédé selon l'une des revendications 1 à
13, caractérisé en ce que la séquence d'ADN codant pour
ladite protéine ainsi que les éléments assurant l'ex-
pression de ladite séquence sont portés par un plasmide.

25 15 - Procédé selon la revendication 14, caracté-
risé en ce que ledit plasmide est un plasmide à réplika-
tion autonome comportant une séquence de répllication au-
tonome efficace chez Tolypocladium : T-ARS.

30 16 - Procédé selon la revendication 14 ou 15,
caractérisé en ce que ledit plasmide assure l'intégra-
tion chromosomique des séquences d'ADN en cause.

17 - Protéine obtenue par la mise en oeuvre du
procédé selon l'une des revendications 1 à 16.

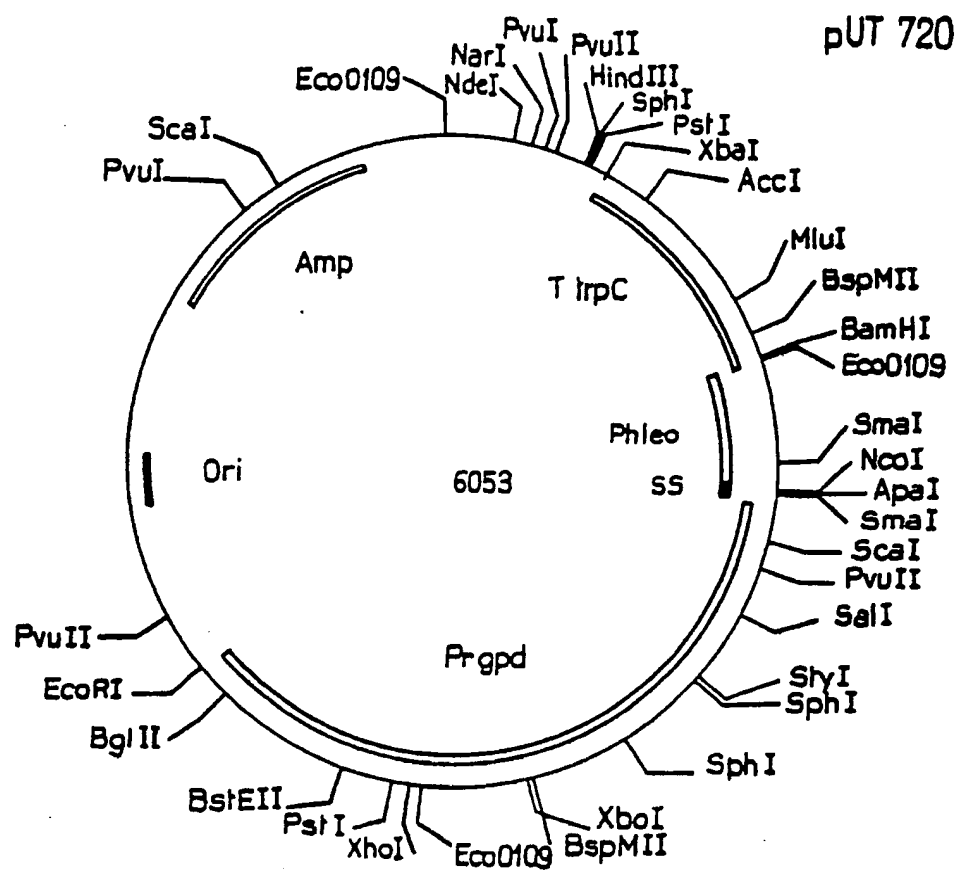
35 18 - Protéine Sh caractérisée en ce qu'elle
est obtenue par la mise en oeuvre du procédé selon l'une
des revendications 1 à 16.

19 - Protéine Sh selon la revendication 18, caractérisée en ce qu'elle comporte la séquence d'acides aminés représentée en figure 2.

5 20 - Souche de Tolypocladium obtenue au cours de la mise en oeuvre du procédé selon l'une des revendications 1 à 16.

21 - Souche de Tolypocladium déposée sous le n° I-880 et ses mutants déficients en activité protéasique et/ou hyperexcréteur de protéine exogène.

1 / 9

FIG.1

2 / 9

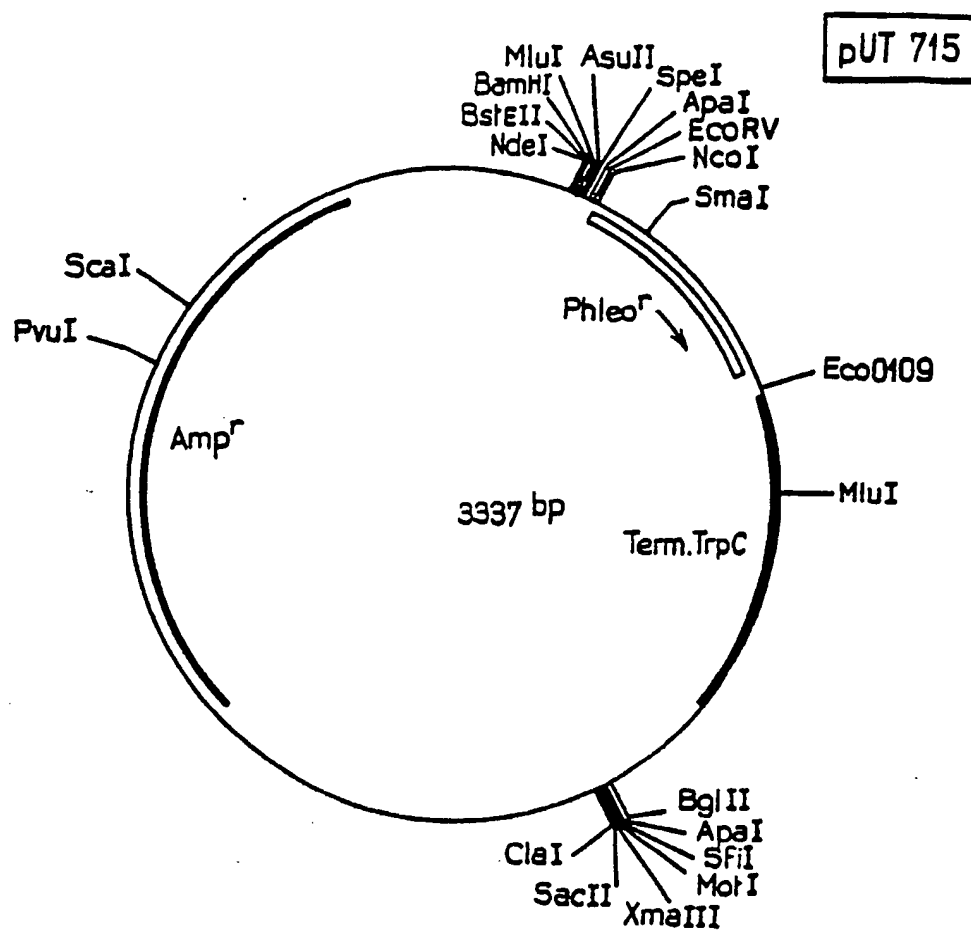
10 20 30 40 50 60
 ATCACCATGTACCGCAAGCTCGCTGTGATTAGCGCTTTTCTCGCAACCGCCCGGGCCAG
 METTyrArgLysLeuAlaValIleSerAlaPheLeuAlaThrAlaArgAlaGln⁺
 70 80 90 100 110 120
 GCCATGCCCAAGTTGACCAGTCCCGTTCCGGTGCTCACC CGCGCGACGTCGCGGGAGCG
 AlaMetAlaLysLeuThrSerAlaValProValLeuThrAlaArgAspValAlaGlyAla
 130 140 150 160 170 180
 GTCGAGTTCTGGACCGACCGGCTCGGTTCTCCCGGACTTCGTGGAGGACGACTTCGCC
 ValGluPheTrpThrAspArgLeuGlyPheSerArgAspPheValGluAspAspPheAla
 190 200 210 220 230 240
 GGTGTGGTCCGGGACGACGTGACCCTGTTTCATCAGCGCGGTCCAGGACCAGGTGGTCCCG
 GlyValValArgAspAspValThrLeuPheIleSerAlaValGlnAspGlnValValPro
 250 260 270 280 290 300
 GACAACACCCTGGCCTGGGTGTGGGTGCGCGGCCTGCACGAGCTGTACGCCGAGTGGTCC
 AspAsnThrLeuAlaTrpValTrpValArgGlyLeuAspGluLeuTyrAlaGluTrpSer
 310 320 330 340 350 360
 CAGGTGGTGTCCACGAAGTTCCGGGACGCCTCCGGGCGGGCCATGACCGAGATCGGCGAG
 GluValValSerThrAsnPheArgAspAlaSerGlyProAlaMetThrGluIleGlyGlu
 370 380 390 400 410 420
 CAGCCGTGGGGCGCGAGTTCGCCCTGCGCGACCGCGCGGCAACTGCGTGCACCTTCGTG
 GlnProTrpGlyArgGluPheAlaLeuArgAspProAlaGlyAsnCysValHisPheVal
 430 440 450 460 470 480
 GCCGAGGAGCAGGACTGACCGACGCCGACCAACACCGCCGTCGACCGCGCGCCACGGG
 AlaGluGluGlnAsp---
 TCCCAGG

SEQUENCE NUCLEOTIDIQUE DU GENE DE LA PROTEINE SH PRECEDEE
 DE LA SEQUENCE SIGNAL SYNTHETIQUE

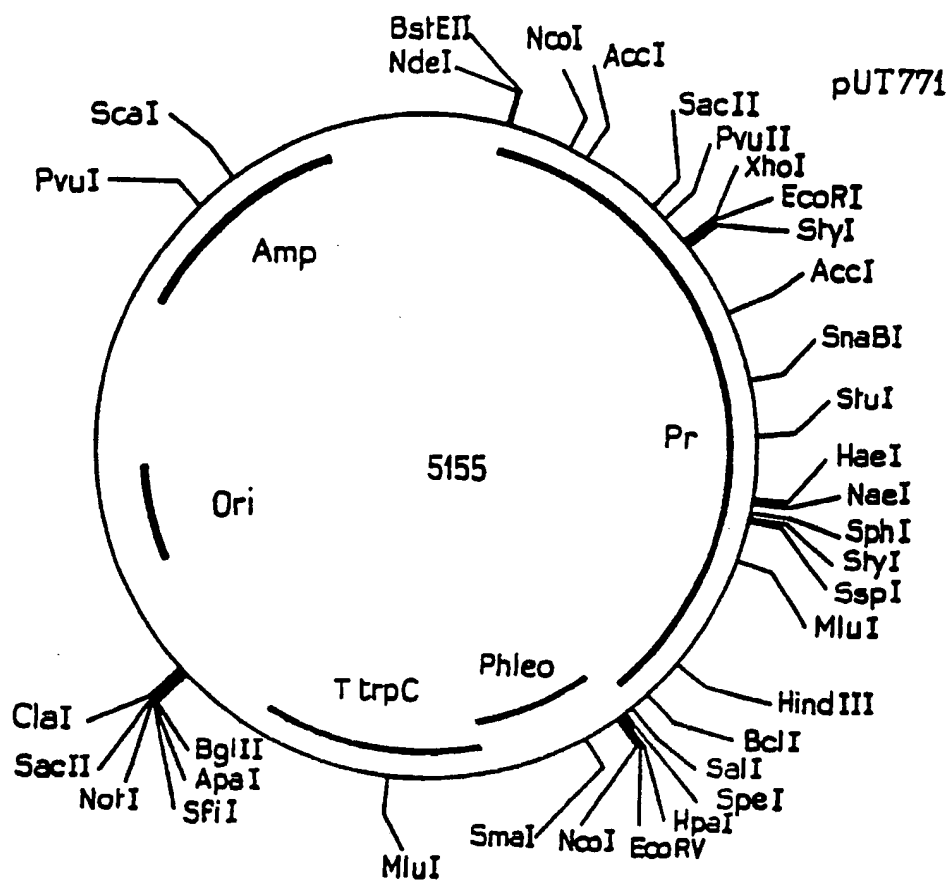
Site de clivage

FIG. 2

3 / 9

FIG. 3

4 / 9

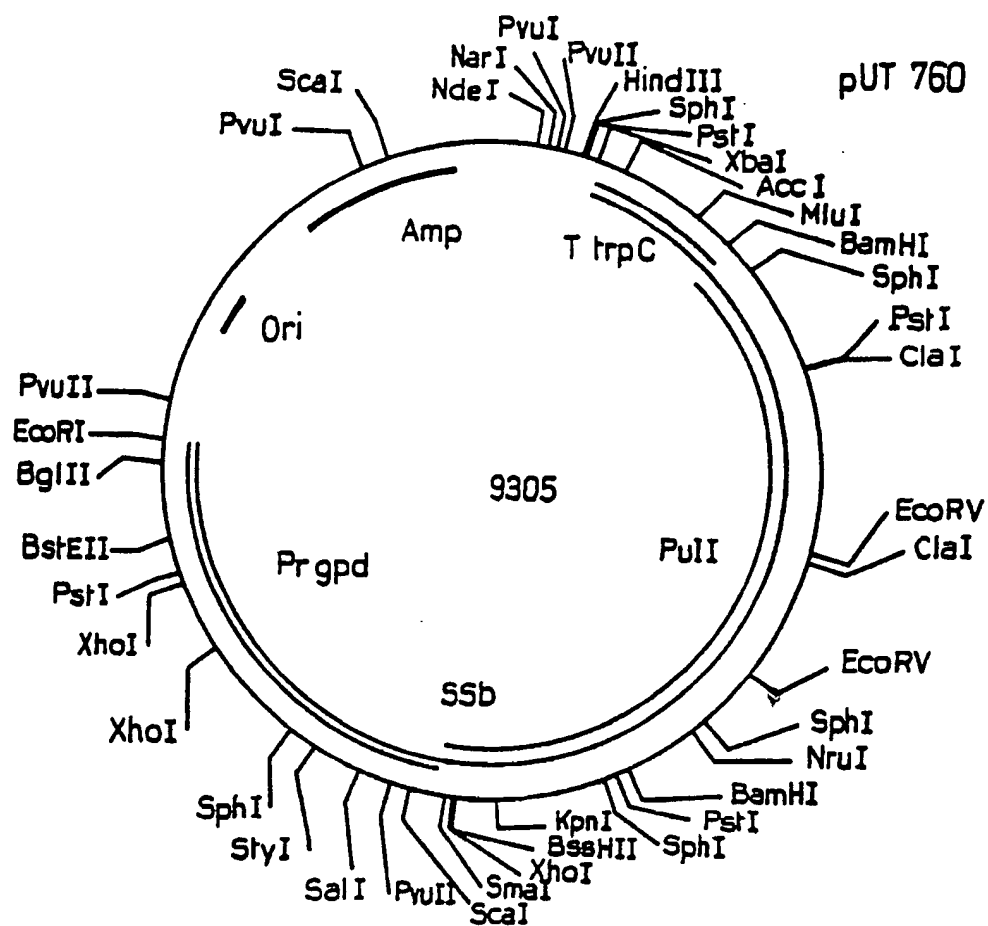
FIG. 4

5 / 9

| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 |
|------|-------------------------------------------------------------------------|----|----|----|----|----|----|
| 1 | CCATGGGTAAAAGTAGTTTTGTAGAGGGGTAGGTCTGAAATCGGTGTAGACGACGTGACACGCTTGGTGG | | | | | | |
| 71 | TGGATCTTGGCAATCCATTGGGCGAACTGGAAGGCGTTCGGAATGGTGGCCGAGAGGAAAACATATCGGA | | | | | | |
| 141 | CCTTGTGGGAAGCATGATGATGGTCTCCTCCACACCACGCCTCGCGTCTTGTCTCGCATGTAGTGGAT | | | | | | |
| 211 | CTCGTCAAACAGGACCCAGGCCACTTCGGGCATAATCTCCGAACCGCGGTACAGCATCGACCGCAAAATC | | | | | | |
| 281 | TCCGTCTGTCATGACCAGGCAGCTGGCCGTGGGATTGATGGTGACATCACCCGTCTCAGGCCACGTCCG | | | | | | |
| 351 | CGAAGATGGCCTCGAAGTCTCGAGAATTGGGGCACCAAGGTC AACATGCGTACGAATACGTCTGCCCC | | | | | | |
| 421 | TTTCCTCTCTTGAGCCAGTCTTTATTTCTGCTTGACCTCAACTTCGGCCAAAGATGCATAATGGATGCGG | | | | | | |
| 491 | AGAGATGCTACATGTAGAGCACCTCCCGTCTGTGTACCCCTGCCAGCAGGCCCATAGTCAATCGCTGGAT | | | | | | |
| 561 | ACCTTTCTGCTGATACTGACCCAAGTTCGGTGGCAAGCCGAAAGAACTTGTCTCGCAGGGGCCAATGTG | | | | | | |
| 631 | ACTACGGCCATCAGAGCCTTGCTCTTGAGCTGGCATCGTGAGACGAGTTGCAAGTAAACAGGCAGGCTC | | | | | | |
| 701 | ACATCTGGAGCCAGAGATGCTCCTAAGGTAGGTAGTATCTAGTAAGATCCGGATTGTACGTACGCCTCGC | | | | | | |
| 771 | TACTGTCATAATTGCCGATGATTTTTGTGGCAAAAACATGCTACTATCGGGCTACGTGCTTGTAACGGTG | | | | | | |
| 841 | TCAGCAGTTGCCCCAGCCTGGAGCCTGCTCACAGGGCCATCATGGCGCTTATGCCAGGCCTGGGATTTC | | | | | | |
| 911 | TTATTGCATTAGTGGTCCGGGCTGACTCTGTCTCACCATTTCCGACTGCGTGTCTTACCAGAAGTCGG | | | | | | |
| 981 | GCTGGCTGACTGATGCGACCGTCTGTCTGCCGTTGGATCGCGGAAACTGAGCTGAGGCCAGCGGCAAAGG | | | | | | |
| 1051 | TACAAGCGCTCTGGCGGCGGGGCGGGCGGTGGCGCAAGTAACTCCCGCATGCCGCCTCCAAGGCTGTCAA | | | | | | |
| 1121 | TATTACTGTTAGCGCCTTAGCGCCTGTAGTGAAGGGCGACCTCCCCCTGTTTTTCAGGGCACTAGAGGC | | | | | | |
| 1191 | TTGAGACAGTTGAGGCAGCGCTGAGCCTCCAGCAGGCACGCGTTCCTGCGCCGCGGTGCCCCTCTGGTG | | | | | | |
| 1261 | GCATTATCTTCCACTCGCACTCCCTCTCCTTCAACCTCGCCTTTTCTCTCCATCTCCATCTCCTTCA | | | | | | |
| 1331 | TTCCAAGCCCAGTCAGTGTCTTCCGCACAGCGGCCAACGACACCCGACTCTCCTCCACTCCGACAGACTC | | | | | | |
| 1401 | TCTGCTGCACTTCCACTGCCTCCTTCGTTCTTTTTTCTCGTCAAACCTCTTCGGACACTTTTGACCACT | | | | | | |
| 1471 | CGAAACAACGCGCGCTGCCGAAGCTTCCTTGATCGCACTCGTGATCTTGAGTCATCGTTCCGAATCG | | | | | | |
| 1541 | CCACGTGCGGCATCTCTTCGATTAAAGCCTACTAGAATCGCTTCTCGCGACTCTTCGACCTTGATCACCTC | | | | | | |
| 1611 | TCTGTGATTGACTGCTTTACGTCTGTCAATCCTGACCAACCGCTGTGACATCCCGACTACTCGAACTAG | | | | | | |
| 1681 | TTAACTAGATATCACCATG | | | | | | |

FIG. 5 : SEQUENCE PROMOTRICE DE pUT 771

6 / 9

FIG.6

7/9

10 20 30 40
ù ù ù ù
GATATCGATTACCATGAAGGCTCTGATCGTTCTCGGCCTGGTCCTGC
METLysAlaLeuIleValLeuGlyLeuValLeuLeu

50 60 70 80 90
ù ù ù ù ù
TCTCGGTTACCGTCCTGGGCAAGGTGTTCTGAACGCTGCGAGCTTGCGC
SerValThrValLEUGlyLysValPheGluArgCysGluLeuAlaArg

100 110 120 130 140
ù ù ù ù ù
GCACCCCTGAAGCGCCTTGGCATGGACGGCTACCGGGGTATCTCGCTTG
ThrLeuLysArgLeuGlyMetAspGlyTyrArgGlyIleSerLeuAla

150 160 170 180 190
ù ù ù ù ù
CCAACTGGATGTGTCTCGCGAAGTGGGAGTCCGGATATAATACTCGCG
AsnTrpMetCysLeuAlaLysTrpGluSerGlyTyrAsnThrArgAla

200 210 220 230 240
ù ù ù ù ù
CTACGAACTACAATGCCGGAGATCGGTCGACCGACTACGGCATCTTCC
ThrAsnTyrAsnAlaGlyAspArgSerThrAspTyrGlyIlePheGln

250 260 270 280
ù ù ù ù
AGATTA ACTCTAGATATTGGTGCAACGATGGCAAGACTCCTGGTGCCG
IleAsnSerArgTyrTrpCysAsnAspGlyLysThrProGlyAlaVal

FIG. 7 ...

8 / 9

290 300 310 320 330
 ù ù ù ù ù
TCAATGCTTGTCACCTGTCCTGCAGCGCTCTGCTCCAGGATAACATTG

AsnAlaCysHisLeuSerCysSerAlaLeuLeuGlnAspAsnIleAla

340 350 360 370 380
 ù ù ù ù ù
CAGACGCTGTTGCATGCGCAAAGCGCGTCCGAGATCCTCAGGGAATCC

AspAlaValAlaCysAlaLysArgValArgAspProGlnGlyIleArg

390 400 410 420 430
 ù ù ù ù ù
GGGCTTGGGTGGCCTGGCGCAATCGGTGCCAAACCGCGACGTCCGGC

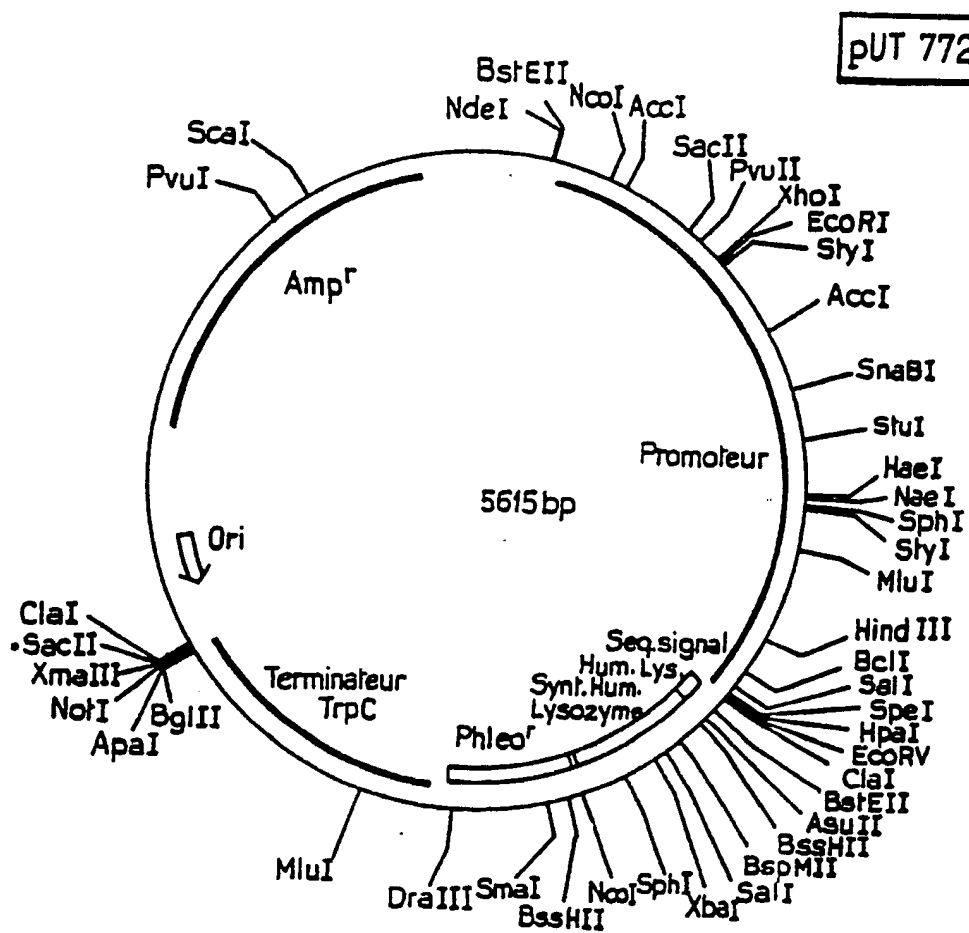
AlaTrpValAlaTrpArgAsnArgCysGlnAsnArgAspValArgGln

440 450 460
 ù ù ù
AGTACGTCCAGGGCTGCGGTGTCTGAGGATCC

TyrValGlnGlyCysGlyVal---

FIG. 7 : Gène synthétique du lysozyme humain

9 / 9

FIG. 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR90/00479

| | | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| I. CLASSIFICATION F SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) ⁶ | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC ⁵ C12N 15/80, C12N 15/56, C12N 15/62, C12N 15/56, IPC: C12P 21/02, //(C12N 15/80, C12R 1:645) | | |
| II. FIELDS SEARCHED | | |
| Minimum Documentation Searched ⁷ | | |
| Classification System | Classification Symbols | |
| IPC ⁵ | C12N 15/80, C12N 15/56, C12N 15/62, C12N 15/65 | |
| Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are included in the Fields Searched ⁸ | | |
| | | |
| III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹ | | |
| Category ⁹ | Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹² | Relevant to Claim No. ¹³ |
| A | GB, A, 2033398 (SANDOZ LTD) 21 May 1980 see page 1, lines 19-28 ---- | 1,20 |
| A | EP, A, 0244234 (ALKO LTD) 4 November 1987 see the whole document ---- | 1,4,5,14-17,20 |
| A | EP, A, 0215594 (GENENCOR INC.) 25 March 1987 see the whole document ---- | 1,4-7,13-17,20 |
| A | Chemical Abstracts, Volume 104, No. 23, 9 June 1986, (Columbus, Ohio, US), S.N. Agathos et al.: "Physiological and genetic factors for process development of cyclosporine fermentations", see page 598, abstract 205460n, & J. Ind. Microbiol. 1986, 1(1), 39-48 ---- | 1,20 |
| A | FEBS Letters, Volume 230, No. 1,2 March 1988, Elsevier Science Publishers B.V., (Amsterdam, NL), A. Gatignol et al.: "Bleomycin resistance conferred by a drug-binding protein", pages 171-175 ----- ./. | 7-9,18 |
| <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>⁹ Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div> | | |
| IV. CERTIFICATION | | |
| Date of the Actual Completion of the International Search | | Date of Mailing of this International Search Report |
| 5 October 1990 (05.10.90) | | 7 November 1990 (07.11.90) |
| International Searching Authority | | Signature of Authorized Officer |
| European Patent Office | | |

| III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET) | | |
|----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| Category * | Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to Claim No |
| | see the whole document (cited in the application) | |
| A | WO, A, 86/01537 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 13 March 1986 see the whole document (cited in the application) | 7-9 |
| A | Biochemical and Biophysical Research Communications, Volume 150, No. 2, 29 January 1988, Academic Press, Inc., (Duluth, MN, US), K. Yoshimura et al.: "Human lysozyme : sequencing of a cDNA, and expression and secretion by Saccharomyces cerevisiae", pages 794-801 see abstract, figure 2 | 10 |
| A | Journal of Bacteriology, Volume 164, No. 2, November 1985, American Society for Microbiology, (Baltimore, US), S. Michaelis et al.: "Characterization and expression of the structural gene for pullulanase, a maltose- inducible secreted protein of Klebsiella pneumoniae", pages 633-638 see the whole document (cited in the application) | 10 |
| A | Bio/Technology, Volume 1, October 1983, (New York, US), S. Shoemaker et al.: "Molecular cloning of exo-cellobiohydrolase I derived from Trichoderma reesei strain L27", pages 691-696 see the whole document; in particular figure 5 | 10 |

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9000479

SA 38489

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 26/10/90. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.


| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| GB-A- 2033398 | 21-05-80 | CH-A- 639961 | 15-12-83 |
| | | CH-A- 642954 | 15-05-84 |
| | | CH-A- 637124 | 15-07-83 |
| | | AU-B- 530379 | 14-07-83 |
| | | AU-A- 5191179 | 24-04-80 |
| | | CA-A- 1129359 | 10-08-82 |
| | | DE-A, C 2941080 | 08-05-80 |
| | | FR-A, B 2439182 | 16-05-80 |
| | | NL-A- 7907609 | 22-04-80 |
| | | SE-B- 448386 | 16-02-87 |
| | | SE-A- 7908350 | 19-04-80 |
| | | US-A- 4288431 | 08-09-81 |
| | | AT-B- 375399 | 25-07-84 |
| | | BE-A- 879402 | 15-04-80 |
| | | JP-A, B, C55055150 | 22-04-80 |
| EP-A- 0244234 | 04-11-87 | JP-A- 63094981 | 26-04-88 |
| EP-A- 0215594 | 25-03-87 | JP-A- 62175183 | 31-07-87 |
| | | AU-A- 6200886 | 05-03-87 |
| WO-A- 8601537 | 13-03-86 | FR-A, B 2569723 | 07-03-86 |
| | | EP-A, B 0193555 | 10-09-86 |
| | | JP-T- 62500350 | 19-02-87 |

EPO FORM P0479

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/FR 90/00479

| | | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷ | | |
| Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB CIB⁵: C 12 N 15/80, C 12 N 15/56, C 12 N 15/62, C 12 N 15/56, C 12 P 21/02, //(C 12 N 15/80, C 12 R 1:645) | | |
| II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE | | |
| Documentation minimale consultée ⁸ | | |
| Système de classification | Symboles de classification | |
| CIB⁵ | C 12 N 15/80, C 12 N 15/56, C 12 N 15/62, C 12 N 15/65 | |
| Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹ | | |
| | | |
| III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS ¹⁰ | | |
| Catégorie ⁶ | Identification des documents cités, ¹¹ avec indication, si nécessaire, des passages pertinents ¹² | N° des revendications visées ¹³ |
| A | GB, A, 2033398 (SANDOZ LTD) 21 mai 1980 voir page 1, lignes 19-28 -- | 1,20 |
| A | EP, A, 0244234 (ALKO LTD) 4 novembre 1987 voir le document en entier -- | 1,4,5,14-17, 20 |
| A | EP, A, 0215594 (GENENCOR INC.) 25 mars 1987 voir le document en entier -- | 1,4-7,13-17, 20 |
| A | Chemical Abstracts, vol. 104, no. 23, 9 juin 1986, (Columbus, Ohio, US), S.N. Agathos et al.: "Physiological and genetic factors for process development of cyclosporine fermentations", voir page 598, résumé 205460n, & J. Ind. Microbiol. 1986, 1(1), 39-48 -- ./. | 1,20 |
| <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>[•] Catégories spéciales de documents cités: ¹¹</p> <p>« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>« E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>« L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>« O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>« P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>« T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>« X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>« Y » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>« & » document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div> | | |
| IV. CERTIFICATION | | |
| Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center; font-weight: bold;">5 octobre 1990</div> | Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center; font-weight: bold;">07. 11. 90</div> | |
| Administration chargée de la recherche internationale <div style="text-align: center; font-weight: bold;">OFFICE EUROPEEN DES BREVETS</div> | Signature du fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center;">  Daniel Weinberg </div> | |

| III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS | | (SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE) |
|--------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| Catégorie * | Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents | N° des revendications visées. |
| A | FEBS Letters, vol. 230, no. 1,2, mars 1988, Elsevier Science Publishers B.V., (Amsterdam, NL), A. Gatignol et al.: "Bleomycin resistance conferred by a drug-binding protein", pages 171-175 voir le document en entier cité dans la demande -- | 7-9,18 |
| A | WO, A, 86/01537 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 13 mars 1986 voir le document en entier cité dans la demande -- | 7-9 |
| A | Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 150, no. 2, 29 janvier 1988, Academic Press, Inc., (Duluth, MN, US), K. Yoshimura et al.: "Human lysozyme: sequencing of a cDNA, and expression and secretion by Saccharomyces cerevisiae", pages 794-801 voir résumé; figure 2 -- | 10 |
| A | Journal of Bacteriology, vol. 164, no. 2, novembre 1985, American Society for Microbiology, (Baltimore, US), S. Michaelis et al.: "Characterization and expression of the structural gene for pullulanase, a maltose-inducible secreted protein of Klebsiella pneumoniae", pages 633-638 voir le document en entier cité dans la demande -- | 10 |
| A | Bio/Technology, vol. 1, octobre 1983, (New York, US), S. Shoemaker et al.: "Molecular cloning of exo-cellobiohydrolase I derived from Trichoderma reesei strain L27", pages 691-696 voir le document en entier; en parti- culier figure 5 ----- | 10 |

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9000479
SA 38489

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 26/10/90
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

| Document brevet cité au rapport de recherche | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | Date de publication |
|-------------------------------------------------|------------------------|-----------------------------------------|------------------------|
| GB-A- 2033398 | 21-05-80 | CH-A- 639961 | 15-12-83 |
| | | CH-A- 642954 | 15-05-84 |
| | | CH-A- 637124 | 15-07-83 |
| | | AU-B- 530379 | 14-07-83 |
| | | AU-A- 5191179 | 24-04-80 |
| | | CA-A- 1129359 | 10-08-82 |
| | | DE-A, C 2941080 | 08-05-80 |
| | | FR-A, B 2439182 | 16-05-80 |
| | | NL-A- 7907609 | 22-04-80 |
| | | SE-B- 448386 | 16-02-87 |
| | | SE-A- 7908350 | 19-04-80 |
| | | US-A- 4288431 | 08-09-81 |
| | | AT-B- 375399 | 25-07-84 |
| | | BE-A- 879402 | 15-04-80 |
| | | JP-A, B, C55055150 | 22-04-80 |
| EP-A- 0244234 | 04-11-87 | JP-A- 63094981 | 26-04-88 |
| EP-A- 0215594 | 25-03-87 | JP-A- 62175183 | 31-07-87 |
| | | AU-A- 6200886 | 05-03-87 |
| WO-A- 8601537 | 13-03-86 | FR-A, B 2569723 | 07-03-86 |
| | | EP-A, B 0193555 | 10-09-86 |
| | | JP-T- 62500350 | 19-02-87 |

EPO FORM P0472

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82